

M.H.

02.11.99

PCT/NL 99 / 00417



Eur päisches
Patentamt

Eur pean
Patent Office

Office eur péen
des brevets

NL 99 / 417

13/01
723
5

REC'D 02 NOV 1999	
WIPO	PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

09 / 720933

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

98202233.7

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

C. PASTUREL

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE,
LA HAYE, LE

13/07/99



Europäisches
Patentamt

Eur pean
Patent Office

Office européen
des brevets

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°: 98202233.7

Anmeldetag:
Date of filing: 02/07/98
Date de dépôt:

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
Stichting Skeletal Tissue Engineering Group Amsterdam
1007 MB Amsterdam
NETHERLANDS

Bezeichnung der Erfindung
Title of the invention:
Titre de l'invention: Botcement met antimicrobiële peptiden

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat
State
Pays

Tag
Date
Date

Aktenzeichen
File no.
Numero de dépôt:

Internationale Patentklassifikation
International Patent classification:
Classification internationale des brevets

/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten
Contracting states designated at date of filing AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE
Etats contractants désignés lors du dépôt

Bemerkungen
Remarks
Remarques

BOTCEMENT MET ANTIMICROBIËLE PEPTIDEN

02. 07. 1998

De uitvinding heeft betrekking op het gebruik van antimicrobiële peptiden (AMP) in calciumfosfaat botcement en vormt een inrichting, die de vertraagde afgifte van de AMP verzorgt ter voorkoming en behandeling 5 van infecties van het bot (osteomyelitis) en de omringende zachte weefsels.

Het voorkomen van infecties van de zachte weefsels en het bot na operaties blijft een zorgkwes-
10 tie bij orthopedische en traumachirurgie. Infectie van botweefsels (osteomyelitis) en/of het omliggende zachte weefsel is zeer moeilijk te genezen en dit is een reden waarom een stringente preventie vereist is. Op dit moment worden hiervoor met antibiotica geïmpregneerde polyme-
15 thylmethacrylaatkorrels (PMMA-korrels) toegepast. Wanneer zij in de chirurgische wond geplaatst zijn fungeren zij als een vertraagde afgifte systeem teneinde hoge lokale concentraties aan antibiotica te verkrijgen, terwijl de systemische concentraties laag blijven. Dergelijke korrels zijn echter niet-resorbeerbaar en daarom is een
20 aanvullende operatie nodig. Verder heeft het intensieve gebruik van antibiotica in de humane en veterinaire geneeskunde geleid tot een resistentie op grote schaal van bacteriën en schimmels tegen antibiotica als gentamycine. Daarom zijn dringend nieuwe therapieën voor de
25 voorkoming en behandeling van bijvoorbeeld osteomyelitis nodig.

De onderhavige uitvinding verschaft daartoe een nieuwe inrichting voor de voorkoming en behandeling van osteomyelitis, welke gebruik maakt van een resorbeerbare
30 calciumfosfaatcement drager en een nieuwe klasse van antibiotische middelen, de zogeheten antimicrobiële peptiden (AMPs).

De AMPs, die worden gebruikt in de uitvinding zijn peptiden, die bestaan uit een aminozuurketen, welke
35 een domein van 10 tot 25 aminozuren bevatten, waarbij de meerderheid van de aminozuren van de ene helft van het domein positief geladen aminozuren zijn en de meerderheid

van de andere helft van het domein ongeladen aminozuren zijn.

De opbouw van deze peptiden kent een aantal variaties. Ten eerste kan het domein een α -helix vormen, waarvan tenminste een meerderheid van de posities 1, 2, 5, 6, 9 (12, 13, 16, 19, 20, 23 en 24) een positief geladen aminozuur bevat, positie 8 een positief of een ongeladen aminozuur is en tenminste een meerderheid van de posities 3, 4, 7, 10, (11, 14, 15, 17, 18, 21, 22, 25) een ongeladen aminozuur bevat. Deze peptiden hebben een laterale amfipathiciteit, dat wil zeggen een maximaal hydrofoob moment bij 100° . Eenvoudig gezegd, zijn deze peptiden aan de linkerzijde hydrofoob en aan de rechterzijde hydrofiel of omgekeerd. Deze peptiden worden hierin "type I" genoemd.

Verder kan het domein een α -helix vormen, waarvan tenminste een meerderheid van de posities 1, 2, 5, 6, 9 (12, 13, 16, 19, 20, 23 en 24) een ongeladen aminozuur bevat, positie 8 een positief of een ongeladen aminozuur is en tenminste een meerderheid van de posities 3, 4, 7, 10, (11, 14, 15, 17, 18, 21, 22, 25) een positief geladen aminozuur bevat. Deze peptiden hebben een laterale amfipathiciteit, dat wil zeggen een maximaal hydrofoob moment bij 100° . Eenvoudig gezegd, zijn deze peptiden aan de rechterzijde hydrofoob en aan de linkerzijde hydrofiel of omgekeerd. Deze peptiden worden hierin "type II" genoemd en zijn in principe de spiegelbeelden van type I peptiden.

Daarnaast kan het domein een α -helix vormen, waarbij tenminste een meerderheid van de posities 1 tot en met 6 (of 7 of 8 of 9 of 10 of 11 of 12) een ongeladen aminozuur bevat, en op positie 7 (of 8 of 9 of 10 of 11 of 12 of 13) tot en met 25 een positief geladen aminozuur voorkomt. Deze peptiden hebben een langsgerichte amfipathiciteit, dat wil zeggen een minimaal hydrofoob moment bij 100° . Deze peptiden zijn aan hun "bovenkant" hydrofoob en aan hun "onderkant" hydrofiel. Dergelijke peptiden worden met "type III" aangeduid.

Omgekeerd kan het domein een α -helix vormen, waarbij tenminste een meerderheid van de posities 1 tot en met 6 (of 7 of 8 of 9 of 10 of 11 of 12) een positief geladen aminozuur bevat, en op positie 7 (of 8 of 9 of 10 of 11 of 12 of 13) tot en met 25 een ongeladen aminozuur voorkomt. Deze peptiden hebben eveneens een langsgerichte amfipathiciteit, en dus een minimaal hydrofoob moment bij 100°. Deze peptiden zijn aan hun "onderkant" hydrofoob en aan hun "bovenkant" hydrofiel. Dergelijke peptiden worden 10 met "type IV" aangeduid.

Tenslotte kan het domein een zogeheten β -strand vormen en op tenminste een meerderheid van de posities 1, 3, 5, 7, 9 (11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 en 25) een positief geladen aminozuur bevatten, en op tenminste een 15 meerderheid van de posities 2, 4, 6, 8, 10, (12, 14, 16, 18, 20, 22, 24) een ongeladen aminozuur. Een dergelijke β -strand is lateraal amfipathisch en heeft een maximaal hydrofoob moment bij 180°. De β -strand structuur is vlakker dan de α -helix en is eenvoudig gezegd links 20 hydrofoob en rechts hydrofiel of omgekeerd. Dit zijn "type V"-peptiden.

De positief geladen aminozuren worden bij voorkeur gekozen uit de groep, die bestaat uit ornithine (O), lysine (K), arginine (R) en histidine (H), terwijl 25 de ongeladen aminozuren bij voorkeur worden gekozen uit de groep, die bestaat uit de alifatische aminozuren glycine (G), alanine (A), valine (V), leucine (L), isoleucine (I), de aminozuren met een dipolaire zijketen methionine (M), asparagine (N), glutamine (Q), serine 30 (S), threonine (T), de aminozuren met een aromatische zijketen phenylalanine (F), tyrosine (Y), tryptofaan (W). Aminozuren op de grens tussen hydrofiel en hydrofoob kunnen uit beide groepen of uit de overige aminozuren gekozen worden.

35 In principe is er nauwelijks verschil in activiteit waar te nemen wanneer een van de positieve aminozuren en/of een van de ongeladen aminozuren is vervangen door een willekeurig aminozuur. De meerderheid van de

positief geladen aminozuren is derhalve bij voorkeur het totale aantal positief geladen aminozuren minus 1 en de meerderheid van de ongeladen aminozuren is bij voorkeur het totale aantal ongeladen aminozuren minus 1.

5 Het domein kan een onderdeel zijn van een groter peptide, maar kan ook zelf het gehele peptide uitmaken. Wanneer het domein onderdeel uitmaakt van een groter peptide kunnen de C-terminale en/of N-terminale aminozuren, die dan extra aanwezig zijn willekeurige
10 aminozuren zijn.

De bijzondere voorkeur gaat uit naar de volgende peptiden van het type I:

	KRLFKELKFSLRKY	(peptide 3)
	KRLFKELLFSLRKY	(peptide 4)
15	KRLFKELKKSLRKY	(peptide 5)
	KRLFKELLKSLRKY	(peptide 6)
	OOLFOELOOSLOOY	(peptide 7)
	OOLFOELLOSLOOY	(peptide 8)
	KRLFKKLFSLRKY	(peptide 9)
20	KRLFKKLLFSLRKY	(peptide 10)

Een voorkeurspeptide van het type III heeft de volgende aminozuurvolgorde:

LLLFLKKRKKRKY (peptide 11)

De peptiden volgens de uitvinding kunnen verder
25 nog modificaties bevatten. Deze modificaties zijn bijvoorbeeld een N-terminale amidering, bijvoorbeeld met azijnzuuranhydride, of een alternatieve afsplitsing van de synthesehars, waardoor de C-terminus gemodificeerd wordt. Voor dit laatste kan gedacht worden aan een ver-
30 vanging van de C-terminale carbonzuurgroep door een amide-, ester-, keton-, aldehyde- of alcoholgroep. Peptiden met een dergelijke modificatie zijn bijvoorbeeld:

KRLFKELKFSLRKY-amide (peptide 12)

KRLFKELLFSLRKY-amide (peptide 13)

35 Naast enkelvoudige peptiden kunnen ook oligomeren worden gemaakt. Dit zijn bij voorkeur lineaire oligomeren van de peptiden volgens de uitvinding. De koppeling kan zowel kop-kop als staart-staart als kop-staart zijn,

hetzij door directe synthese hetzij door postsynthetische enzymatische koppeling. Voor de vorming van een transmembraan porie is een minimale peptidenlengte vereist. Oligomeren van de peptiden volgens de uitvinding zijn
5 dubbel lang en daardoor in principe beter in staat de gehele fosfolipide dubbellaag van de bacteriële celmembraan in een keer te overspannen. Hierdoor zou de werking van het peptide nog verder kunnen verbeteren. Daarnaast geeft verlenging van de peptiden een stabilisatie van de
10 helixconformatie. Meestal dient een spacer te worden ingevoegd. Bij directe synthese van kop-staart gekoppelde oligomeren kan een spacer op maat worden ingebouwd door het gebruik van een keten van onnatuurlijke aminozuren van de juiste lengte, bijvoorbeeld β -alanine, γ -aminoboterzuur, ϵ -aminocapronzuur, etc. Ook kunnen heterodifunctionele koppelingsreagentia, zoals die commercieel verkrijgbaar zijn om peptide-antigenen aan dragereiwitten te koppelen (bijvoorbeeld 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide (EDC), *m*-maleimidobenzoyl)-*N*-hydroxysuccinimide ester (MBS), *N*-succinimidyl 3-[pyridyldithio]propionaat (SPDD) etc. gebruikt worden om lineaire oligomeren met een tussengevoegde spacer te maken. Voor kop-kop en staart-staartkoppelingen kunnen driewaardige aminozuren worden gebruikt, zoals asparaginezuur (D),
25 glutaminezuur (E), ornithine (O), lysine (K), serine (S), cysteïne. Dergelijke oligomeren zijn bijvoorbeeld:

	KRKFHEKHHSRGCY-CYGRHSHHKEHFKRK	(peptide 14)
	YGRHSHHKEHFKRKC-CKRKFHEKHHSRGCY	(peptide 15)
	$^{\alpha}\text{N}, ^{\epsilon}\text{N}-(\text{KRKFHEKHHSRGCY})_2\text{K-amide}$	(peptide 16)
30	$^{\alpha}\text{N}, ^{\epsilon}\text{N}-(\text{KRLFKEKLFSLRKY})_2\text{K-amide}$	(peptide 17)
	$^{\alpha}\text{N}, ^{\epsilon}\text{N}-(\text{KRLFKKLKFSLRKY})_2\text{K-amide}$	(peptide 18)

Peptiden 14 en 15 zijn verkregen door synthese van peptide 2 met een additionele C-terminale, respectievelijk N-terminale cysteïne, waarna het oligomeer verkregen is
35 door luchtoxidatie. Peptiden 16, 17 en 18 zijn verkregen door gebruikmaking van de Multi-Antigen Peptide (MAP) strategie, waarbij als eerste aminozuur een lysine met zowel op de α - als op de ϵ -aminogroep een Fmoc bescher-

ming als eerste aminozuur aan de synthesehars werd gebruikt, waardoor gelijktijdig twee identieke aminozuurketens (peptiden 2, 3 en 9) op één lysinemolecuul werden gesynthetiseerd.

- 5 De hierin beschreven peptiden hebben geen of nauwelijks hemolytische activiteit in fysiologische buffers, zoals PBS (fosfaatgebufferde zoutoplossing). Een lage activiteit tegen erythrocyten van humane oorsprong is een indicatie voor lage toxiciteit. Deze selectiviteit is
10 essentieel voor het gebruik van deze peptiden als antibiotica.

De peptiden vertonen een breed spectrum aan antibacteriële en anti-schimmel activiteit, zelfs tegen methycilline-resistente Staphylococcus aureus (MRSA),
15 Pseudomonas aeruginosa (welke in het bijzonder gevaarlijk is bij osteomyelitis) en amphotericine-B resistente Candida albicans.

De uitvinding maakt verder gebruik van botmateriaal dat na uitharding botcement vormt en waarbij de
20 AMPs homogeen in het uitgeharde botcement zijn verdeeld. Het is biocompatibel, resorbeerbaar en inert en vormt zich bij lichaamstemperatuur. Het uiteindelijke cement heeft bovendien voldoende sterkte en stijfheid om als bptvervanger dienst te doen.

- 25 Volgens de uitvinding is gevonden dat de opname van de AMPs in het cement niet van invloed zijn op de mechanische eigenschappen daarvan.

Teneinde de AMPs in het cement op te nemen worden zij opgelost in een vloeibaar medium, bij voorkeur
30 water, met het botmateriaal vóór harding daarvan gemengd.

Bij voorkeur wordt een bloedeiwit bevattende oplossing, in het bijzonder albumine, gebruikt om de AMPs in oplossing te houden teneinde een homogene verdeling van de AMPs in het uiteindelijk uitgeharde botcement te
35 waarborgen.

In een voorkeursuitvoeringsvorm van botmateriaal bevat het calciumfosfaat. Vanwege de biocompatibiliteit is daarbij in het bijzonder sprake van een mengsel

van di-calciumfosfaat, tri-calciumfosfaat, tetra-calciumfosfaat en/of hydroxyl-apathiet.

De uitvinding heeft verder betrekking op een werkwijze ter vervaardiging van een botmateriaal volgens
5 de uitvinding, waarbij het botmateriaal wordt uitgehard tot botcement en waarbij de AMPs homogeen in het uitgeharde botcement wordt verdeeld. Zoals gezegd, worden de AMPs in een vloeibaar medium, bij voorkeur water, opgelost en met het botmateriaal vóór uitharding daarvan
10 gemengd. Aldus wordt bewerkstelligd dat er een langere afgifteperiode wordt verschaft, waarin de AMPs na aanbrenging van het botmateriaal kunnen worden afgegeven aan de omgeving. Daarbij is telkens het uitgangspunt dat de AMPs steeds alleen daar werken waar dat nodig is.

15 De uitvinding is tevens gerelateerd aan een inrichting ter toediening van botmateriaal voorzien van AMPs overeenkomstig de uitvinding, waarbij is voorzien in ten minste twee compartimenten voor het afzonderlijk houden van het botmateriaal en AMPs, in een mengkamer
20 voor het mengen van het botmateriaal en de AMPs, alsmede in een spuitmond voor het vanuit de mengkamer spuiten van het mengsel.

De uitvinding zal nader worden toegelicht aan de hand van een bespreking van een aantal proeven volgens
25 een voorkeursvariant van de uitvinding, waarbij eerst een procedure voor het vervaardigen van het onderhavige botmateriaal met toegevoegde AMPs zal worden besproken.

1. Een steriele cementpoeder bestaat uit een mengsel
30 van alfa-tricalciumfosfaat, tetracalciumfosfaat-monoxjde en di-calciumfosfaat-dibasisch, in een verhouding van 75:20:5, of anders indien gewenst.
2. Een steriele AMP oplossing (oplossing (A)) bestaat
35 uit 4 milimolair HCl in water met daarin opgelost 0,1% runderserumalbumine en AMPs in een concentratie naar wens variërend van 2×10^{-5} % tot 2%.

3. Een tweede steriele oplossing (oplossing (B)) bestaat uit water met daarin opgelost 12% natriumsuccinaat en 5% chondroïtine-succinaat.
- 5 4. Oplossing (A) wordt 1 op 1 gemengd met oplossing (B), onder steriele omstandigheden.
5. Een volumedeel oplossing (A+B) wordt gemengd met twee volumedelen cementpoeder onder steriele omstandigheden. Dit kan gebeuren;
- 10
- a. in een bakje en gemengd met een spatel, waarna de cementpasta onmiddellijk in het lichaam van de patiënt ter plaatse wordt aangebracht en
- 15 daar uithardt;
- b. via een spuit met twee kamers, waarvan er één het cementpoeder en de andere oplossing (A+B) bevat; met behulp van de spuit worden poeder en
- 20 vloeistof ter plekke in het lichaam samengebracht waarna het mengsel ter plaatse uithardt.
- c. in een bak, mal of container, waarna het mengsel buiten het lichaam uithardt en al of niet
- 25 wordt vermalen tot een poeder van de gewenste korrelgrootte, waarna het in het lichaam van de patiënt wordt aangebracht.

EPO - DG 1

1

02. 07. 1998

CONCLUSIE

Botmateriaal ter voorkoming en behandeling van osteomyelitis, welk materiaal is voorzien van antimicrobiële peptiden (AMPs) als gedefinieerd in de beschrijving, welke AMPs gedurende een tijdsperiode aan de omgeving kan worden afgegeven, waarbij het botmateriaal na uitharding botcement vormt en dat de AMPs homogeen in het uitgeharde botcement zijn verdeeld.

